

ADAPTIVE PROZESSE IM XYLITSTOFFWECHSEL
UND IHRE AUSWIRKUNGEN

von

GERHARD STEIN

Mainx 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554814_0023

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. Dr. K. Lang

ADAPTIVE PROZESSE IM XYLITSTOFFWECHSEL
UND IHRE AUSWIRKUNGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

GERHARD STEIN

aus Mainz

MAINZ 1966

Dekan: Professor Dr. J. Borneff
Referent: Professor Dr. K. H. Bässler
Korreferent: Professor Dr. Dr. K. Lang
Tag der mündl. Prüfung: 4. November 1966



Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Methodik	2
Ergebnisse	6
I. Indirekte Hinweise auf Stoffwechseladaptation als Ursache für Resorptionsbeschleunigung	6
II. Umsatzgeschwindigkeit für Xylit bei adaptierten und nicht-adaptierten Ratten	7
III. Intracelluläre Lokalisation des Xylitstoffwechsels	8
IV. Limitierende Faktoren für den Xylitumsatz	10
V. Aktivität der Xylitdehydrierung im Lebercytoplasma bei adaptierten und nicht-adaptierten Ratten	11
VI. Organspezifität des Xylitumsatzes im Zusammenhang mit der Adaptation	11
Diskussion	12
Zusammenfassung	14
Literatur	15

EINLEITUNG

Untersuchungen über die Resorptionsbedingungen von Xylit haben erkennen lassen, daß dieser Ersatzzucker für Diabetiker wie verschiedene andere Zucker zu jenen therapeutischen Substanzen gehört, die die Darmwand nur langsam passieren. Nach oraler Verabreichung kommt es zum Auftreten osmotischer Durchfälle. Durch Gewöhnung an Xylit kann jedoch eine signifikante Steigerung der enteralen Resorption erreicht werden (1).

Für die adaptive Beschleunigung der Xylitresorption aus dem Darmlumen müssen im wesentlichen zwei Mechanismen als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden:

1. Regelmäßige Zufuhr von Xylit als nicht-physiologischer Bestandteil in der Nahrung könnte zur Ausbildung eines aktiven Transportsystems führen.
2. Abbaumöglichkeiten in der Darmschleimhaut selbst oder ein gesteigerter Umsatz im Organismus könnten reine Diffusionsvorgänge erleichtern und die Passage von Xylit aus dem Darmlumen in die Blutbahn beschleunigen.

In vitro-Versuche mit isolierten Dünndarmabschnitten von Ratten haben ergeben:

1. Keine Steigerung der Durchtrittsrates bei xylitadaptierten Ratten gegenüber nicht-adaptierten Kontrolltieren.
2. Dinitrophenol oder Phlorrhizin, die den aktiven Transport von Glucose spezifisch hemmen, haben keinen Einfluß auf die Passage von Xylit.
3. Gleiche oder erhöhte Konzentration auf der Serosa-Seite verhindert den Übertritt von Xylit aus dem Darmlumen.
4. Der Temperaturkoeffizient des Xylitdurchtritts durch den Darm beträgt ca. 1,2, liegt damit in der Größenordnung physikalischer Prozesse (Diffusion) und spricht nicht für das Vorliegen eines enzymatisch katalysierten chemischen Vorgangs.

Anhand dieser Befunde muß der aktive Transport bei der enteralen Xylitresorption als Angriffspunkt für eine Adaptation ausgeschlossen werden.

In der Darmschleimhaut von Ratten, die einen gleichmäßigen Anteil von Xylit im Futter erhalten haben, läßt sich gegenüber Kontrolltieren eine Aktivitätszunahme der Sorbitdehydrogenase angedeutet erkennen. Diese Beobachtung entspricht einem geringfügigen Anstieg von Zwischenprodukten bei den Inkubationsversuchen mit Dünndarmabschnitten.

Eine Förderung des Xylitabbaus in der Darmschleimhaut ist demnach wahr-

scheinlich. Eine Umsatzsteigerung, wie sie im Gesamtdarm zu erwarten wäre, hätte jedoch zu geringes Ausmaß, um die Xylitresorption wesentlich zu beschleunigen.

Es bleibt die Frage, ob es zu einer adaptiven Intensivierung des Xylitstoffwechsels im Organismus kommt, mit der Folge einer rascheren Elimination von Xylit aus dem Blut, was zu einer Erleichterung der Diffusion und beschleunigten Resorption enteralen Xylits führen müßte.

Diese Frage ist gleichzeitig das Thema der vorliegenden Arbeit.

METHODIK

Mitochondrien wurden aus Rattenleber isoliert. Die frisch entnommene Leber wurde in 0,25 m Rohrzucker im Verhältnis 1:6 homogenisiert; Kerne und Zelltrümmer bei 6000 g·min abzentrifugiert. Aus dem Überstehenden werden bei 75 000 g·min die Mitochondrien sedimentiert und zweimal durch Resuspendieren und Zentrifugieren bei derselben Beschleunigung gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugieren werden die Mitochondrien in einer Salzlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) aufgenommen, so daß 1 ml Suspension die Mitochondrien von 1 g Frischleber enthält.

Zur Gewinnung von Rattenleber-Cytoplasma für die Warburg-Versuche wurden 10 g Leber mit 30 ml 0,25 m Rohrzucker homogenisiert und 45 min bei 100 000 g zentrifugiert.

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten im Cytoplasma wurden 4 g Leber ad 25 ml mit 0,9%iger KCl-Lösung homogenisiert und wie oben zentrifugiert.

Xylitbestimmung im Blut:

0,1 ml Blut wurden in 1,1 ml kalte 6%ige Perchlorsäure geblasen. Nach Zentrifugieren wurden 0,8 ml des Überstandes zum Ausfällen von Perchlorat und Einstellen des für die Messung gewünschten pH-Wertes mit dem gleichen Volumen 0,7 m K_3PO_4 versetzt und im Eisbad stehen gelassen. Nach Abzentrifugieren des Perchloratniederschlags wurden 0,6 ml (je nach Xylitmenge auch mehr oder weniger) zum optischen Test eingesetzt.

Xylitbestimmung in den Geweben:

Gewebe wurden möglichst rasch entnommen und im Verhältnis 1 g Frischgewebe : 5 ml 6%ige Perchlorsäure homogenisiert. Nach Zentrifugieren wurde ein aliquoter Teil des Überstandes mit dem gleichen Volumen 0,7 m K_3PO_4 versetzt und weiterbehandelt wie bei Blut.

Xylitbestimmung im optischen Test:

Die Xylitbestimmung selbst erfolgte im enzymatisch-kinetischen Test nach BÄSSLER und Mitarb. (2).

Ansatz 1,0 ml 0,3 m TRIS-Puffer pH 8,1

0,1 ml NAD^+ (10 mg/ml)

0,6 ml Probe

0,01 ml Sorbitdehydrogenase BOEHRINGER/Mannheim

H_2O ad 3 ml

Im Photometer Eppendorf wird bei 366 m μ die Extinktionsänderung von der 10. bis 25. Sekunde nach dem Start gemessen. Aus einer Einkurve nach LINEWEAVER-BURK läßt sich die Xylitkonzentration errechnen (3).

Die Korrektur auf den Blutgehalt von Geweben erfolgte nach der von HOLZER und Mitarbeitern beschriebenen Methode (4).

Der Proteingehalt von Homogenaten, Mitochondrien und Cytoplasma wurde nach der Biuret-Methode bestimmt (5).

Die Ansätze für die Warburg-Versuche sind in der Legende zu Tabelle 3 beschrieben.

Adaptation der Versuchstiere an Xylit:

Zur Adaptation erhielten die Ratten 10 bis 14 Tage lang 10% Xylit zur Basaldiät, oder sie bekamen für die gleiche Zeitspanne täglich zwei intraperitoneale Injektionen mit je 300 mg Xylit in 15%iger Lösung. Die Art der Xylitadaptation sowie die Zusammensetzung der Basaldiät ist jeweils in den Legenden zu den Tabellen angegeben.

Die Ratten (Sprague-Dawley) hatten zum Zeitpunkt der Untersuchungen ein Gewicht von 220 bis 280 g.

Bestimmung der Eliminationskonstanten und der Halbwertszeit:

Den Versuchstieren wurden 2 ml einer Lösung mit 500 mg Xylit in die Schwanzvene injiziert und 1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung nachgespritzt. 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min nach der Injektion wurde nach Kappen der Schwanzspitze 0,1 ml Blut zur Xylitbestimmung entnommen.

Die Auswertung des Blutspiegelabfalls erfolgte nach dem von DOST beschriebenen Verfahren (6).

Im semilogarithmischen Diagramm aufgetragen, nähert sich die Blutspiegelkurve einer Geraden (siehe Abb.).

Ordinate logarithmisch: Xylit in mg%.

Abszisse linear: Zeit nach der Injektion in min.

Dies bedeutet, daß die Abnahme einer Exponentialfunktion folgt:

$$C_2 = C_1 \cdot e^{-k(t_2 - t_1)}$$

C = Konzentration zur Zeit t.

e = Basis der natürlichen Logarithmen.

k = Steigungsfaktor der Geraden.

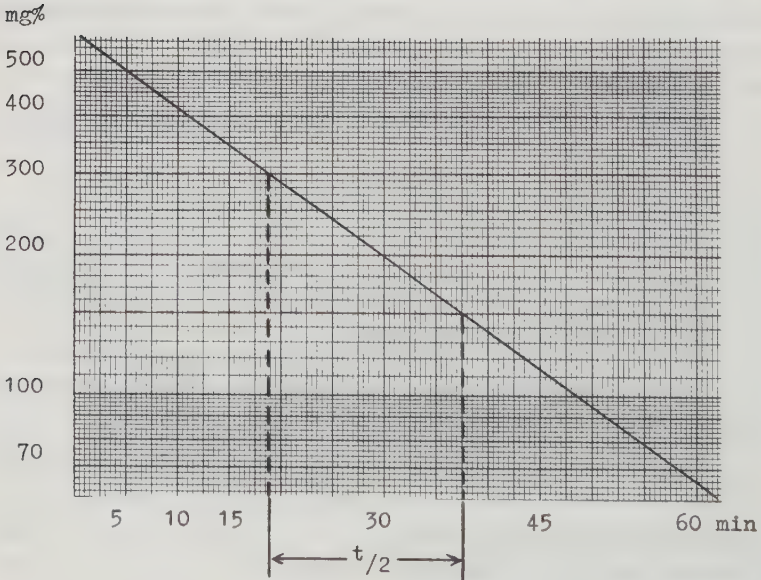
$$k = \frac{\ln C_1 - \ln C_2}{t_2 - t_1}$$

Das Intervall, in dem die Konzentration C_1 auf die Hälfte absinkt, ist die Halbwertszeit.

Dann gilt:

$$k = \frac{\ln C_1 - \ln (0,5 \cdot C_1)}{t/2}$$

$$k = \frac{\ln 2}{t/2} \quad \text{oder:} \quad t/2 = \frac{0,693}{k}$$



Bestimmung von Enzymaktivitäten:

Ansatz zur Messung der Xylitdehydrierung:

1,0 ml 1%ige Xylitlösung
1,0 ml 0,3 m TRIS-Puffer pH 8,1
0,1 ml NAD⁺ (10 mg/ml)
0,01 ml Cytoplasma
H₂O ad 3 ml

Im Photometer Eppendorf wird bei 366 m μ die Extinktionszunahme im linearen Bereich gemessen und auf eine Minute berechnet.

Messung der D-Xylulokinase (modifiziert nach HICKMAN und ASHWELL(7)):

Ansatz: 0,1 ml 0,4 m Triäthanolamin-Puffer pH 7,4 mit MgCl₂
(10,2 mg/ml)
0,1 ml 0,02 m Cystein-HCl (neutralisiert)
0,1 ml 0,06 m ATP
0,2 ml 0,03 m D-Xylulose
0,1 ml Cytoplasma

Inkubation 5 min bei 30°. Abstoppen durch Zusatz von
0,2 ml 1 m Ba-Acetat
und 3,0 ml Äthanol

Bestimmung der nicht-phosphorylierten D-Xylulose im enzymatischen Test:

0,2 ml Überstand aus dem Ansatz
0,05 ml NADH + H⁺ (10 mg/ml)
0,02 ml Sorbitdehydrogenase BOEHRINGER
0,1 m TRIS-Puffer pH 7,0 ad 3 ml
Endwertbestimmung.

Die Transketolase-Aktivität wurde nach dem Verfahren von BRUNS und Mitarbeitern bestimmt (8). Statt Hämolyolat wurden 0,1 ml 1 : 4 verdünntes Lebercytoplasma (Herstellung mit KCl siehe oben) mit durchschnittlich 0,3 bis 0,6 mg Protein eingesetzt.

Ansatz: 0,5 ml 0,1 m TRIS-Puffer pH 7,6
0,5 ml 0,02 m Ribose-5-phosphat
0,1 ml Cytoplasma (1:4 verdünnt)
H₂O ad 2 ml

Inkubation 15 min bei 30°. Abstoppen mit
1,0 ml 10%iger Trichloressigsäure

Bestimmung der Sedoheptulose:

1,0 ml Überstand aus dem Ansatz

0,2 ml konzentrierte HCl

80 min bei 100° erhitzen. Abkühlen.

0,2 ml FeCl₃-Lösung (13 mg/100 ml 2 n HCl)

0,08 ml Orcin (6%ig in Äthanol)

3 min bei 100° erhitzen. Abkühlen.

1,5 ml Äthanol

6 Stunden abgedunkelt stehen lassen.

Die Extinktion wird bei 625 mμ gegen Sedoheptulose-Standard gemessen.

Alle Aktivitäten sind in internationalen Einheiten angegeben (9). (μMole Substratumsatz pro min bei 30°).

Die statistische Beurteilung erfolgte im t-Test nach STUDENT.

ERGEBNISSE

I. Indirekte Hinweise auf Stoffwechseladaptation als Ursache für Resorptionsbeschleunigung

Wie eingangs erwähnt, reagieren Ratten auf die Verfütterung von Xylit mit osmotischen Durchfällen, die jedoch nach einer gewissen Zeit der Gewöhnung an Xylit wieder verschwinden. Diese Erscheinung ist leicht als Folge der inzwischen eingetretenen Resorptionsbeschleunigung zu deuten. Für die Frage einer Adaptation im Bereich des Stoffwechsels sind zwei Beobachtungen von Interesse.

1. 10 Ratten wurde zweimal täglich 300 mg Xylit in 15%iger Lösung intraperitoneal injiziert. Erhielten diese Tiere nach 10 bis 12 Tagen erstmalig 10% Xylit im Futter, so blieben die Durchfälle aus.

2. Einer zweiten Gruppe von 10 Ratten wurde 10% Xylit im Futter verabreicht. Waren die Durchfälle nach eingetretener Adaptation verschwunden, so traten sie von neuem auf, wenn diese Tiere zusätzlich zum xylithaltigen Futter eine Subcutaninjektion mit 600 mg Xylit pro Tag erhielten.

Es zeigt sich also einerseits, daß die Adaptation auch durch die parenterale Applikation von Xylit erreicht werden kann.

Im anderen Falle muß angenommen werden, daß die Anreicherung im Blut

Tabelle 1

Eliminationskonstanten für Xylit bei adaptierten
Ratten und nicht-adaptierten Kontrolltieren.

	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C	
	K	A	K	A	K	A
1	0,0211	0,0539	0,0458	0,0644	0,0377	0,0606
2	0,0215	0,0416	0,0348	0,0897	0,0409	0,0611
3	0,0165	0,0525	0,0473	0,0473	0,0389	0,0511
4	0,0220	0,0357	0,0436	0,0563	0,0369	0,0562
5	0,0285	0,0464	0,0579	0,0623	0,0345	0,0582
6	0,0280	0,0277	0,0533	0,0658	0,0457	0,0436
7	0,0190	0,0349	0,0297	0,0620	0,0223	0,0527
8	0,0186	0,0277		0,0646	0,0433	0,0482
9	0,0154	0,0374		0,0677	0,0496	0,0498
10	0,0228	0,0340			0,0470	0,0452
11	0,0271	0,0235				
12	0,0236	0,0389				
13	0,0270	0,0288				
14		0,0260				
15		0,0420				
16		0,0376				
17		0,0418				
18		0,0341				
19		0,0321				
20		0,0359				
M	0,0224	0,0366	0,0449	0,0645	0,0397	0,0537
S	0,0043	0,0082	0,0101	0,0112	0,0078	0,0063
P	<0,0005		0,0025 - 0,0005		<0,0005	

Gruppe A: Kontrolltiere (K) erhielten Altromin ad libitum;
adaptierte Tiere (A) dazu 10-15 Tage 10% Xylit im Futter.

Gruppe B: Kontrolltiere 2/3 Altromin und 1/3 Magermilchpulver;
adaptierte Tiere dazu 10-12 Tage täglich zweimal 300 mg Xylit
intraperitoneal in 15%iger Lösung.

Gruppe C: Kontrolltiere 2/3 Altromin und 1/3 Magermilchpulver;
adaptierte Tiere zusätzlich 8Tage 10% Xylit im Futter und
600 mg Xylit subcutan.

(M = Mittelwert. S = Standardabweichung.)

Tabelle 2

Abfall des Xylitspiegels in Blut und verschiedenen Geweben.

Injektion von 500 mg Xylit in eine Schwanzvene.
 Nach den angegebenen Zeiten wird Xylit im Blut der Vena cava inferior, in der Leber, im Skeletmuskel und epididymalen Fettgewebe bestimmt. Die Zahlen für jede Zeit sind Mittelwerte von vier nicht-adaptierten Ratten und bedeuten
 für Blut: mg Xylit pro 100 ml
 für Gewebe: mg Xylit pro 100 g Frischgewicht.

Xylitspiegel				
min	Blut	Leber	Muskel	Fettgewebe
5	768	381	204	72
15	392	272	125	108
30	301	157	107	77
45	95	13	33	17
60	67	9	18	10
180	0,6	1,6	11	1,5

durch subcutan injiziertes Xylit die Resorption aus dem Darm beeinträchtigt.

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Adaptation an Xylit im Sinne einer Umsatzsteigerung im Organismus erfolgt, und rasche Beseitigung aus der Blutbahn die Voraussetzung einer beschleunigten Resorption von Xylit aus dem Darm darstellt.

II. Umsatzgeschwindigkeit für Xylit bei adaptierten und nicht-adaptierten Ratten

Zur Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit von Xylit wurde nach intravenöser Belastung der Blutspiegelabfall gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte nach DOST (6) durch Ermittlung der Eliminationskonstanten (siehe Methodik). Die Aufstellung der k-Werte von adaptierten und nicht-adaptierten Ratten ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Gruppeneinteilung wurde nach Applikationsart oder Zusammensetzung der Basaldiät vorgenommen (siehe Legende).

Die Notwendigkeit einer Unterteilung nach diesen Gesichtspunkten ergab sich, nachdem deutliche Unterschiede der Umsatzgeschwindigkeit von Xylit in Abhängigkeit von Zustand und Aufzucht der Tiere zu erkennen waren. So wiesen Ratten, die 2/3 Altromin und 1/3 Magermilchpulver erhielten, eine höhere Umsatzrate auf als Tiere, die nur Altromin bekamen. Bei den Fütterungsversuchen mit Xylit ist also sehr darauf zu achten, daß die Kontrollgruppe aus der gleichen Aufzucht stammt und die gleiche Grundnahrung erhält. Die Untersuchungen müssen ebenso im gleichen Zeitraum durchgeführt werden. Ein Vergleich zwischen adaptierten und nicht-adaptierten Tieren ist nur unter diesen Bedingungen zulässig.

Aus Tabelle 1 ist klar ersichtlich, daß an Xylit gewöhnte Tiere eine höhere Eliminationskonstante aufweisen als die Ratten, die nicht mit Xylit vorbehandelt waren. Dies gilt für jede der drei Gruppen. Die Unterschiede sind statistisch hoch signifikant. Die durchschnittliche Halbwertszeit für die Elimination von Xylit aus dem Blut beträgt:

	nicht-adaptiert	adaptiert
Gruppe A:	31 min	19 min
Gruppe B:	15,4 min	10,7 min
Gruppe C:	17,5 min	12,9 min

Die Elimination einer Substanz aus dem Blut kann nicht unbedingt mit deren Umsatz gleichgesetzt werden. Bei der Abnahme des Blutspiegels nach Glu-

cosebelastung zum Beispiel spielen der Zeitbedarf der Diffusion in die Verteilungsräume, sowie Insulinproduktion und gegenregulatorische Mechanismen in bezug auf die eigentliche Glucoseverwertung eine große Rolle.

Im Zusammenhang mit dem Blutspiegelabfall von Xylit könnten, neben dem echten Umsatz, Ausscheidung oder Verteilung noch einen Einfluß auf die k -Werte haben.

Die Ausscheidung von Xylit lag während der Versuchsdauer unter 1% der Dosis und kann demnach vernachlässigt werden. Einen Überblick über den Umfang der Diffusion von Xylit und die Verteilungsgeschwindigkeit bieten die in Tabelle 2 aufgeführten Zahlen. Hierzu wurde neben dem Blutspiegelabfall die Xylitkonzentration in verschiedenen Geweben zu bestimmten Zeiten nach der Belastung mit 500 mg i.v. gemessen.

Die maximale Konzentration in den Geweben ist bereits nach 5 min erreicht. Lediglich im Fettgewebe ist zwischen der 5. und 10. min nach der Injektion noch ein geringer Anstieg zu verzeichnen. Eine Fixierung von Xylit in den Geweben wird nicht festgestellt. Der Abfall des Gewebespiegels verläuft zeitgleich mit dem des Blutes. Dies bedeutet, daß die Verteilung schon zu einem Zeitpunkt abgeschlossen ist, der außerhalb des Bereichs liegt, in dem die Messungen für den Blutspiegelabfall vorgenommen werden.

Auf Grund dieser Erwägungen ist im Rahmen der Versuchsanordnung die Elimination aus dem Blut tatsächlich ein Maß für den Umsatz von Xylit.

III. Intracelluläre Lokalisation des Xylitstoffwechsels

Die Möglichkeit, exogenes Xylit nach Gewöhnung verstärkt umzusetzen, wie sie bei Ratten nachgewiesen werden konnte, läßt auf eine Aktivierung im Bereich der am Stoffwechsel beteiligten katalytischen Systeme schließen. Funktion und Reihenfolge der einzelnen Enzyme, die den Abbauweg von Xylit festlegen, ist aus folgender Skizzierung ersichtlich:

Tabelle 3

Xylitoxydation im rekombinierten System aus
Mitochondrien und Cytoplasma.

Rattenlebermitochondrien wurden mit 0,25 m Rohrzuckerlösung isoliert, aber zuletzt in einem Medium folgender Zusammensetzung suspendiert:

0,012 m ATP, 0,12 m KCl, 0,03 m MgSO_4 , 0,08 m Phosphatpuffer pH 7,4 und 0,18 m TRIS-Puffer pH 7,4.

Die Warburg-Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

0,5 ml Mitochondriensuspension

1,0 ml Cytoplasma

0,5 ml 0,02 m NAD^+

0,3 ml 0,4 m Nicotinamid

0,2 ml Cytochrom c (5 mg/ml)

wo angegeben 0,5 ml 5%ige Xylitlösung

H_2O ad 3 ml

im Einsatz 0,2 ml 2 n KOH

Temperatur 37° . Versuchsdauer 1 Stunde.

µl Sauerstoffaufnahme in einer Stunde					
Vers. Nr.	Mitochondrien		Mitochondrien + Cytoplasma		
	ohne Xylit	mit Xylit	ohne Xylit	mit Xylit	Differenz
1	2	16	125	216	91
2	5	11	193	365	172
3	36	38	180	314	134
4	58	60	112	325	203
5	43	40	98	220	122
6	-	-	370	555	185
7	-	-	159	214	55

Tabelle 4a

Aktivitäten von Xylit-Dehydrierung, D-Xylulokinase und Transketolase im Leber-Cytoplasma von nicht-adaptierten Ratten.

Bestimmung der Enzymaktivitäten siehe Methodik. Die Tiere waren die nicht-adaptierten Kontrolltiere der Gruppe B, Tabelle 1.

	Enzymaktivität µMole pro min und mg Protein		
	Xylitdehydrierung	D-Xylulokinase	Transketolase
1	0,0235	0,0500	-
2	0,0203	0,0447	0,0314
3	0,0255	0,0242	0,0442
4	0,0200	0,0497	0,0513
5	0,0210	0,0382	0,0405
6	0,0249	0,0350	0,0367
7	0,0246	0,0580	0,0529
8	0,0217	0,0510	0,0360
9	0,0240	0,0338	0,0360
10	0,0179	0,0280	0,0421
11	0,0247	0,0500	0,0446
12	0,0222	0,0506	0,0406
13	0,0270	0,0747	0,0347
14	0,0156	0,0569	0,0362
M	0,0224	0,0461	0,0406
S	0,0032	0,0133	0,0041

Tabelle 4b

	Enzymaktivität μMole pro min und g Frischgewicht		
	Xylitdehydrierung	D-Xylulokinase	Transketolase
1	2,85	6,06	-
2	2,22	4,89	3,44
3	2,61	2,48	4,53
4	2,45	6,09	6,31
5	2,51	4,56	4,84
6	2,85	4,01	4,20
7	2,68	6,31	5,75
8	2,05	4,81	3,40
9	2,44	3,44	3,67
10	2,51	3,92	5,89
11	2,67	5,41	4,83
12	2,28	5,19	4,16
13	2,73	7,56	3,51
14	1,54	5,62	3,58
M	2,46	5,03	4,47
S	0,35	1,31	1,00

Tabelle 5

Vergleich manometrisch und optisch gemessener Aktivitäten der Xylit-Dehydrierung im Leber-Cytoplasma.

Manometrische Messung siehe Legende Tabelle 3.

Optische Messung mit Xylit und NAD^+ siehe Methodik.

Vers. Nr.	Xylitumsatz ($\mu\text{Mole pro Std. und mg Cytoplasma-Protein}$)	
	aus Warburg-Versuch berechnet	aus optischem Test berechnet
1	0,73	0,78
2	0,50	0,60
3	1,36	0,96
4	1,80	1,31
6	1,31	1,35
7	0,50	0,89

Tabelle 6

Aktivität der Xylit-Dehydrierung im Leber-Cytoplasma
bei adaptierten und nicht-adaptierten Ratten.

Bestimmung der Enzymaktivität siehe Methodik.

Diät der Kontrolltiere: 2/3 Altromin und 1/3 Magermilchpulver ad libitum; adaptierte Tiere zusätzlich 10-14 Tage 10% Xylit im Futter.

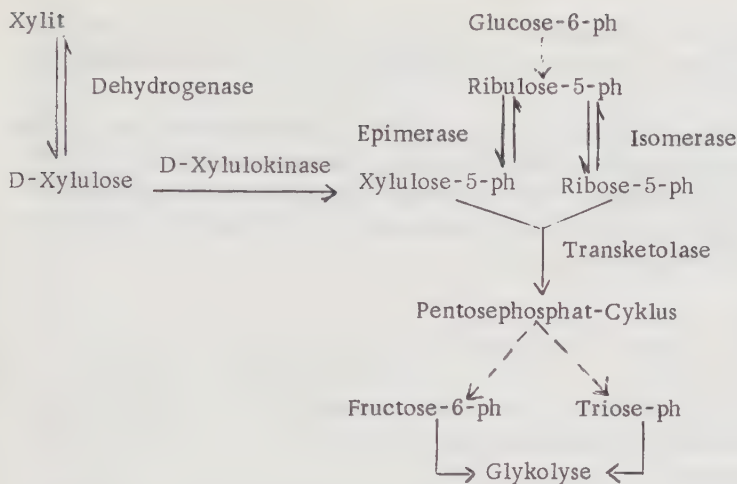
Aktivität: μ Mole Xylit dehydriert pro min und						
	mg Cytpl. Protein		g Frischgewicht		Gesamtleber	
	K	A	K	A	K	A
1	0,0235	0,0333	2,85	3,64	33,3	33,9
2	0,0203	0,0374	2,22	4,09	23,3	40,9
3	0,0255	0,0395	2,61	3,09	31,3	37,7
4	0,0200	0,0331	2,45	3,19	28,7	30,9
5	0,0210	0,0305	2,51	3,24	32,1	46,7
6	0,0249	0,0273	2,85	3,58	29,4	31,5
7	0,0246	0,0241	2,68	3,13	25,2	26,3
8	0,0217	0,0252	2,05	3,46	23,6	21,5
9	0,0240	0,0264	2,44	3,07	26,1	37,1
10	0,0179	0,0317	2,51	3,53	24,6	43,1
11	0,0247	0,0414	2,67	4,56	27,0	47,9
12	0,0222	0,0403	2,28	4,21	36,0	37,0
13	0,0270	0,0296	2,73	3,16	33,0	44,9
14	0,0156	0,0338	1,54	4,27	16,3	51,7
15		0,0368		4,44		47,5
16		0,0303		3,07		47,3
17		0,0241		2,05		33,6
M	0,0224	0,0320	2,46	3,52	27,9	38,8
S	0,0032	0,0056	0,35	0,64	5,2	8,5
P	< 0,0005		< 0,0005		< 0,0005	

Tabelle 7

Aktivitäten der Xylit-Dehydrierung in verschiedenen Organen.

Bestimmung der Enzymaktivitäten siehe Methodik.
Die Aktivität in der Skelettmuskulatur ist zu gering um sicher erfaßt werden zu können. Die Werte stammen von einem Versuchstier und sind in Nanomolen angegeben.

Aktivität: nMole Xylit dehydriert pro min und			
	mg Protein	g Frischgewicht	Gesamt-Organ
Leber	24,7	2670	27 000
Niere	6,5	855	2 138
Testes	1,5	77	238
Dünndarm- schleimhaut	0,26	7	76
Herz	0,40	23	24
Lunge	0,13	13	20
epididymales Fettgewebe	0,56	7	16
Gehirn	0,10	3	10



a) Lokalisation der Xylitdehydrierung

Da Enzyme, die die Dehydrierung von Xylit katalysieren können, sowohl in Mitochondrien als auch im Cytoplasma nachgewiesen wurden, entstand zunächst die Frage der intracellulären Lokalisation des Xylitstoffwechsels.

Die Prüfung im Warburg-Versuch sollte klären, ob die von HOLLMANN (10) in Meerschweinchenleber gefundene mitochondriale Xylitdehydrogenase (1.1.1.9 : Xylit : NAD-Oxydoreductase "D-Xylulose bildend") oder die cytoplasmatische "Sorbitdehydrogenase" (1.1.1.14 : L-Idit : NAD-Oxydoreductase) für die Umsetzung von exogenem Xylit verantwortlich ist.

Eine direkte Xylitoxydation durch Mitochondrien konnte nicht mit Sicherheit manometrisch erfaßt werden.

Bei der Dehydrierung durch die cytoplasmatische Sorbitdehydrogenase fungiert NAD^+ als der physiologische Wasserstoff-Akzeptor. Es mußte also ein System gefunden werden, um die Reoxydation von reduziertem NAD^+ als direkten Sauerstoffverbrauch in der Warburg-Apparatur ablesen zu können.

Wir suspendierten Mitochondrien in einer Salzlösung (Zusammenstellung siehe Tabelle 3), um sie für $\text{NADH} + \text{H}^+$ durchlässig zu machen. Auf diese Weise vorbehandelte Mitochondrien in Kombination mit reiner Sorbitdehydrogenase BOEHRINGER und Xylit waren in der Lage, die gewünschte Vermittlerrolle zu übernehmen. Dieses System war demnach besonders geeignet, beim Nachweis der Xylitoxydation im Cytoplasma als "Indikator" zu dienen.

Im Gegensatz zu Mitochondrien konnten im Cytoplasma deutliche Dehydrogenaseaktivitäten gemessen werden. Tabelle 3 bringt eine Aufstellung dieser Werte.

Die Kinetik des Xylitumsatzes zeigt, daß die Geschwindigkeit der Oxydation unter diesen Bedingungen nicht über eine Stunde konstant bleibt. Die Kurve der Sauerstoffaufnahme verläßt nach etwa 30 min den linearen Bereich und flacht langsam ab. Danach kann nur die Aktivität während der ersten 20 min als repräsentativ gelten.

b) Lokalisation der D-Xylulokinase

D-Xylulokinase (2.7.1.17 : ATP : D-Xylulose-5-phosphat-transferase) wurde von HICKMAN und ASHWELL aus Leber-Acetonpulver isoliert und gereinigt (7). Hinweise auf die Lokalisation in der Zelle konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Die Zellfraktionierung ergab Xylulokinaseaktivität ausschließlich im Cytoplasma.

Da auch die Enzyme des Pentosephosphat-shunts im Cytoplasma lokalisiert sind, vollzieht sich also der gesamte Stoffwechsel von exogenem Xylit bis zur Glykolyse im Cytoplasma.

IV. Limitierende Faktoren für den Xylitumsatz

Eine Zunahme der Enzymaktivitäten im Xylitstoffwechsel als Folge der Adaptation muß sich insbesondere dann auswirken, wenn eines der Enzyme zuvor die Umsatzgeschwindigkeit begrenzte.

Sorbitbelastungen haben oft zu Fructosämie und Fructosurie geführt. Im Gegensatz dazu wurden nach extremen Belastungen mit Xylit niemals Zwischenprodukte ausgeschieden oder im Blut nachgewiesen (11, 12). Diese Beobachtung läßt sich gut mit den Ergebnissen vereinbaren, die wir bei der Untersuchung der einzelnen Enzymaktivitäten erhalten haben.

In Tabelle 4 lassen sich die Aktivitäten der Xylitdehydrierung, der D-Xylulokinase und Transketolase, die im Lebercytoplasma von Ratten bestimmt wurden, vergleichen. Aus der Gegenüberstellung geht hervor, daß der Engpaß auf dem Abbauweg des Xylit bei der Dehydrierung liegt. Phosphoriboisomerase und Phosphoketo-3-epimerase weisen etwa 100 fach höhere Aktivitäten auf. Vergleichende Untersuchungen mit Lebercytoplasma im Warburg-Versuch und

optischen Test ergaben umgerechnet auf 1 Stunde übereinstimmende Werte der Dehydrogenaseaktivität (siehe Tabelle 5).

Die Messung der Dehydrogenaseaktivität im direkten optischen Test erfolgte unter optimalen Bedingungen. Dies trifft für die Bestimmung von Kinase und Transketolase nicht im gleichen Maße zu (bei Transketolase ist z.B. unter den Testbedingungen eine Sättigung mit Xylulose-5-phosphat nicht gesichert). Dies läßt vermuten, daß die Verhältnisse in vivo noch günstiger für Kinase und Transketolase gegenüber Sorbitdehydrogenase liegen.

Es muß also angenommen werden, daß eine Steigerung der Dehydrogenaseaktivität den Gesamtumsatz von Xylit beschleunigen kann.

V. Aktivität der Xylitdehydrierung im Lebercytoplasma bei adaptierten und nicht-adaptierten Ratten

Im Lebercytoplasma von adaptierten und nicht-adaptierten Ratten wurde unter Verwendung von Xylit als Substrat die Aktivität der Sorbitdehydrogenase (1.1.1.14 : L-Idit : NAD-Oxydoreductase) im direkten optischen Test untersucht. Die Aufstellung der Meßwerte zeigt Tabelle 6. Sowohl die spezifische Aktivität der Sorbitdehydrogenase als auch die Aktivität bezogen auf 1 g Frischgewicht und die Gesamtkaktivität der Leber weisen einen Anstieg bei adaptierten gegenüber nicht-adaptierten Tieren auf. Die Unterschiede sind statistisch hoch signifikant.

Für D-Xylulokinase und Transketolase ließ sich eine Aktivitätszunahme bei den adaptierten Ratten statistisch nicht sichern.

VI. Organspezifität des Xylitumsatzes im Zusammenhang mit der Adaptation

Abschließend wird die Frage untersucht, ob Änderungen der Xylitdehydrierung auf die Leber beschränkt bleiben bzw. wieweit andere Gewebe am Gesamtumsatz von Xylit beteiligt sind.

Dazu wurden die Aktivitäten der Sorbitdehydrogenase im Cytoplasma verschiedener Gewebe gemessen.

Ein Blick auf Tabelle 7 läßt erkennen, daß die Leber den weitaus größten Teil der Xylitdehydrierung bewältigt. Die nächstgrößte Aktivität wird in der Niere gefunden. Der Gesamtumsatz dieses Organs liegt aber schon eine Zehnerpotenz niedriger.

Die Summe des Gesamtumsatzes in allen übrigen Geweben würde nur ein Zehntel des Umsatzes von Xylit in der Leber ausmachen. Selbst eine geringfügige adaptive Steigerung der Dehydrogenaseaktivität, wie sie zum Beispiel in der Darmschleimhaut zu beobachten, statistisch aber nicht zu sichern war, hätte keine merkliche Beschleunigung des Gesamtumsatzes von Xylit zur Folge.

Entsprechend dieser Überlegung wurde auf weitergehende diesbezügliche Untersuchungen verzichtet.

DISKUSSION

Bekanntlich wird durch die cytoplasmatische Sorbitdehydrogenase nicht nur Xylit zu Xylulose dehydriert, sie vermag auch die Reaktion Sorbit : Fructose zu katalysieren. Ebenso dient sie als Katalysator bei der Dehydrierung verschiedener anderer Polyalkohole.

Wir haben darum zur Ermittlung der Enzymaktivität bei adaptierten und nicht-adaptierten Ratten neben Xylit auch Fructose und Sorbit als Substrat gewählt. Die Messungen im optischen Test wurden jeweils unter den für die Reaktion optimalen Bedingungen vorgenommen. Die mittleren Umsatzraten für Sorbit und insbesondere für Fructose liegen höher als die von Xylit:

Fructose	Sorbit	Xylit	
0,2106	0,0327	0,0224	(= spez. Aktivität)

Die Aktivitäten der Sorbitdehydrogenase im Lebercytoplasma nicht-adaptierter Ratten mit Fructose, Sorbit und Xylit als Substrat verhalten sich zueinander wie 9,4 : 1,5 : 1. Dieses Verhältnis ist in den einzelnen Geweben sehr verschiedenen (in der Lunge zum Beispiel: 14 : 1,7 : 1).

Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, daß es sich bei der Sorbitdehydrogenase um einen Komplex von Isozymen handelt mit unterschiedlicher Affinität zu den Substraten.

Die Adaptation an Xylit macht sich zwar auch am Anstieg der Umsatzraten für Sorbit und Fructose bemerkbar, aber nicht im gleichen Maße wie für Xylit:

Fructose	Sorbit	Xylit	
0,2335	0,0396	0,0320	(= spez. Aktivität)

Das Verhältnis von 7,4 : 1,2 : 1 spricht dafür, daß bei Adaptation die Xylitdehydrierung bevorzugt gesteigert wurde.

Ausgehend von der Beobachtung, daß Ratten eine beschleunigte Resorption von Xylit aus dem Darm aufwiesen, wenn sie zuvor längere Zeit mäßige Dosen (10% im Futter ad libitum) bekommen hatten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Ursachen einer solchen Adaptation untersucht. Es wurde eine signifikante Steigerung der Elimination von Xylit aus dem Blut gefunden, die mit einer erhöhten Umsatzgeschwindigkeit von Xylit gleichgesetzt werden konnte. Verantwortlich für den rascheren Umsatz war eine Zunahme der Aktivität der Xylitdehydrierung im Lebercytoplasma. Der Mechanismus dieser Aktivitätssteigerung ist noch ungeklärt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Enzymsynthese.

Diese Frage soll hier diskutiert werden.

Ein für Xylit spezifischer Effekt ist die gesteigerte Bildung von Pentosen. Dies läßt ein Vergleich der Aktivitäten der Xylitdehydrierung und der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, die sonst die Pentosebildung einleitet, erkennen ($2,46 \pm 0,35$ gegenüber 0,78 bis 1,77 μ Mole pro g Leber und min) (13). Xylit könnte auf diese Weise die Nucleinsäure- und damit die Proteinsynthese begünstigen. Darauf sprechen dann Enzyme an, die leicht alimentär beeinflusst werden können. Die Verfütterung von Magermilchpulver führte, wie gezeigt, zu einer höheren Umsatzrate von Xylit gegenüber den Ratten, die diesen Zusatz in einem relativ eiweißarmen Futter (Altromin) nicht erhalten hatten. Die Adaptation an Xylit konnte jedoch die Umsatzgeschwindigkeit zusätzlich steigern.

Durch wiederholte Zufuhr von Sorbit gelingt eine ähnliche Adaptation, die sich in einer Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit von Sorbit ausdrückt. Eine Aktivitätsänderung der Sorbitdehydrogenase konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich stellt die weitere Verwertung der Fructose das zu überwindende Hindernis für den Gesamtumsatz von exogenem Sorbit dar.

Befunde dieser Art sind Ausgangspunkt folgender Hypothese:

Das reichere Angebot an Protein könnte allgemein die Synthese von Enzymen begünstigen. Durch das vermehrt anfallende Substrat aber würde die Synthese in Richtung jenes Enzyms gelenkt, das für den Gesamtumsatz den limitierenden Faktor darstellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ursache einer adaptiven Beschleunigung der Xylitresorption aus dem Darm wird in einer Intensivierung des Xylitstoffwechsels gesehen.

Die Elimination von Xylit aus dem Blut ist bei adaptierten Ratten signifikant erhöht. Sie kann mit einer gesteigerten Umsatzgeschwindigkeit gleichgesetzt werden. Spezifische Untersuchungen des Xylitstoffwechsels in der Rattenleber zeigen, daß die Dehydrierung von Xylit im Cytoplasma stattfindet. Auch die D-Xylulokinase ist im Cytoplasma lokalisiert.

Beim Vergleich der Enzymaktivitäten wird in der Dehydrierung der limitierende Faktor für den Xylitumsatz gefunden. Die Adaptation an Xylit führt zu einer signifikanten Zunahme der Dehydrogenaseaktivität in der Leber.

Der Rest-Organismus ist am Gesamtumsatz von Xylit nur unwesentlich beteiligt.

LITERATUR

- (1) BÄSSLER, K.H., W.BELZER und G.STEIN:
Xylitstoffwechsel und Xylitresorption.
I. Beschleunigung der Xylitresorption durch Adaptation.
Biochem.Z. (im Druck)
- (2) BÄSSLER, K.H., V.UNBEHAUN und W.PRELLWITZ:
Enzymatische Bestimmung von Xylit in biologischem Material.
Biochem.Z. 336, 35 (1962)
- (3) LINEWEAVER, H. and D.BURK:
The Determination of Enzyme Dissociation Constants.
J.Amer.Chem.Soc. 56, 658 (1934)
- (4) HOLZER, H., G.SEDLMAYR und M.KIESE:
Bestimmung des Blutgehalts von Leberproben zur Korrektur biochemischer Analysen.
Biochem.Z. 328, 176 (1956)
- (5) BEISENHERZ, G., H.J.BOLTZE, Th.BÜCHER, R.CZOK, K.H.GARBADE, E.MEYER-ARENDT und G.PFLEIDERER:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z.Naturforschg. 8b, 555 (1953)
- (6) DOST, F.H.:
Der Blutspiegel. Leipzig: Georg Thieme 1953
- (7) HICKMAN, J. and G.ASHWELL:
Purification and Properties of D-Xylulokinase in Liver.
J.Biol.Chem. 232, 737 (1958)
- (8) BRUNS, F.H., E.DÜNNWALD und E.NOLTMANN:
Über den Stoffwechsel von Ribose-5-phosphat in Hämolysaten.
III. Quantitative Bestimmung von Sedoheptulose-7-phosphat und einige Eigenschaften der Transketolase der Erythrocyten und des Blutserums.
Biochem.Z. 330, 497 (1953)
- (9) Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry.
Elsevier Publ. Comp. Amsterdam 1965

(10) HOLLMANN, S.:

Trennung, Reinigung und Eigenschaften der mitochondrialen Xylit-Dehydrogenasen der Meerschweinchenleber.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 317, 193 (1959)

(11) BÄSSLER, K.H., H. HOLZMANN, W. PRELLWITZ und J. STECHERT:

Pentosenstoffwechsel nach Belastung mit Xylose oder Xylit. Ausscheidung von Ketopentosen im Harn.

Klin. Wschr. 43, 27 (1965)

(12) MEHNERT, H., J.D. SUMMA und H. FÖRSTER:

Untersuchungen zum Xylitstoffwechsel bei gesunden, leberkranken und diabetischen Personen.

Klin. Wschr. 42, 382 (1964)

(13) GLOCK, G.E. and P. McLEAN:

Levels of Enzymes of the Direct Oxidative Pathway of Carbohydrate Metabolism in Mammalian Tissues and Tumors.

Biochem. J. 56, 171 (1954)

Herrn Professor Dr. K . H . B ä s s l e r danke ich für die Überlassung
des Themas, für fachlichen Rat und freundliche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 27. Dezember 1936 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Philipp Stein und seiner Ehefrau Margarethe in Mainz geboren.

Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich das Gymnasium am Kurfürstlichen Schloß in Mainz.

Mit Abschluß der Reifeprüfung begann ich im Sommersemester 1956 das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich im Februar 1962 das Staatsexamen ablegte.

Meine Tätigkeit als Medizinalassistent umfaßte zehn Monate Innere Medizin, elf Monate Chirurgie und drei Monate Frauenheilkunde.

Die Bestallung als Arzt erhielt ich im April 1964.

Seit Oktober 1964 bin ich Assistent am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Mainz.

